

Experimentelle Untersuchungen über den Einbau radioaktiv markierten Thymidins bei der Ratte nach Bestrahlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Detlef Geiger
aus Stuttgart

1967

9079

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153519_0057

Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. R. Bauer

Experimentelle Untersuchungen
über den Einbau radioaktiv markierten Thymidins
bei der Ratte nach Bestrahlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Detlef Geiger
aus Stuttgart

1967

D e k a n : Professor Dr. med. F. Lembeck

1. Berichterstatter; Dozent Dr. med. U. Feine

2. Berichterstatter; Professor Dr. med. R. Bauer

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
1. Allgemeiner Teil - Fragestellung	1
2. Spezieller Teil	2
Methodik	5
1. Arbeitsgang	5
2. Eichung	7
3. Tiermaterial	10
Ergebnisse	11
1. Vor Bestrahlung	11
2. Nach Bestrahlung	12
Diskussion	16
1. Vor Bestrahlung	16
2. Nach Bestrahlung	17
Zusammenfassung	21
Literaturverzeichnis	22
Lebenslauf	26

EINLEITUNG

1. Allgemeiner Teil - Fragestellung

Seit den Untersuchungen von Bergonié und Tribondeau ist bekannt, daß die Zellteilung ein besonders strahlenempfindlicher Mechanismus ist. Zellen mit hoher Teilungsrate weisen demnach eine höhere Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen auf, als Zellen und Gewebe, die sich nicht oder nur noch sehr selten teilen. Es muß sich also in der Phase der Mitose oder während der Vorbereitung zur Mitose ein sehr strahlensensibler Vorgang abspielen, der bis jetzt noch nicht endgültig charakterisiert werden konnte.

Hier haben die neuen Methoden der Markierung von Metaboliten neue Wege eröffnet. So ist es heute möglich, mit tritiummarkiertem Thymidin die der Mitose vorausgehende Phase zu verfolgen sowie die Einwirkung ionisierender Strahlen auf diese Phase und damit auf den gesamten Zellzyklus zu beobachten.

Im Jahre 1942 führten VON EULER und VON HEVESY ihre ersten Markierungsuntersuchungen des Zellstoffwechsels mit Radiophosphor durch. Ein Nachteil des ^{32}P ist jedoch seine kurze Halbwertszeit von nur einigen Tagen (14,2 d) sowie das schlechte autoradiographische Auflösungsvermögen. Für Untersuchungen, die über einen längeren Zeitraum laufen, eignen sich deshalb die Isotope ^{14}C und ^3H wesentlich besser (HWZ von ^{14}C : 5568 a, von ^3H : 12,26 a).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Verteilung der DNS-Vorstufe Thymidin untersucht werden, das zu diesem Zweck mit dem oben erwähnten Isotop Tritium (^3H) markiert war.

Dabei ergab sich folgende Fragestellung:

- 1.) Wie hoch ist die Thymidinaufnahme in verschiedenen normalen Gewebearten?
- 2.) Welche Änderungen der Thymidinaufnahme und Verteilung zeigen sich in den ersten 24 Stunden nach einer Bestrahlung?

- 3.) Welche Methodik des Tritiumnachweises ist für diese Untersuchungen geeignet?

2. Spezieller Teil

Tritium und Tritiumnachweis:

Eine natürliche Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der radioaktiven Indikatoren ist eine entsprechende Meßtechnik. Da wir mit Tritium-Thymidin arbeiteten, war also zunächst eine geeignete Methode des Tritiumnachweises notwendig.

Das Tritium ist ein Isotop des Wasserstoffs mit dem Atomgewicht 3. Es wurde 1939 von ALVARETZ und CORNOK bei der Reaktion ${}^2_1\text{H} (d, p) {}^3_1\text{H}$ gefunden. Heute stellt man es durch die Reaktion ${}^6_3\text{Li} (n, \alpha) {}^3_1\text{H}$ her. Tritium sendet bei seinem Zerfall eine weiche β -Strahlung mit einer maximalen Energie von 0,018 MeV aus. Die maximale Reichweite in H_2O beträgt dabei 8 μ , die mittlere Reichweite 1,5 μ . Seine Halbwertszeit ist 12,26 Jahre.

Der Nachweis dieses β -Strahlers kann auf mehreren Wegen erfolgen. Bevorzugt wird heute die Autoradiographie oder der Nachweis im flüssigen Szintillator.

Bei der Autoradiographie werden die histologischen Schnitte mit einer dünnen strahlenempfindlichen Photoemulsion bedeckt. Nach einer gewissen Zeit werden die Präparate entwickelt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Die Zahl der Silberkörner über der markierten Substanz steht dabei in direkter Relation zu der vorhandenen Tritiummenge. Der Vorzug dieser Methode liegt darin, daß wir die genaue Verteilung des Tritiums auf die einzelnen Zellen im Gewebe und seine Lokalisation im Kern beobachten können. Um jedoch den Mittelwert der Aktivität des Gewebes anzugeben, muß eine große Zahl von Einzelzellen ausgezählt werden.

Im Gegensatz dazu ergibt die Messung im flüssigen Szintillator einen Querschnitt über alle Zellarten des Gewebes, wobei selbstverständlich über einzelne Zellen keine Aussage gemacht werden kann. Autoradiographischer Nachweis und meß-

technische Methoden ergänzen sich somit.

Beim Nachweis im flüssigen Szintillator bedarf es einer gewissen Vorbehandlung. Um die Aktivität genau bestimmen zu können, muß das Meßgut möglichst gleichmäßig und farblos im Szintillator gelöst sein. Ist dies nicht der Fall, so entsteht ein Quencheffekt d.h. ein Teil der Lichtquanten wird absorbiert, wodurch die Ausbeute im Spektrometer stark gesenkt werden kann. Dieser Tatsache kann in einem begrenzten Ausmaß durch die Messung in zwei verschiedenen Kanälen Rechnung getragen werden. Sinn der Doppelmessung ist es, die spektrale Verschiebung der Aktivitätskurve zu erfassen um dann entsprechende Korrekturen anbringen zu können. Die zweite Bedingung, die gleichmäßige Verteilung, kann durch die Homogenisierung der Proben nur ungenügend erfüllt werden. Aus diesem Grunde werden die Proben verbrannt, wobei Tritiumwasser entsteht. Durch die anschließende Lösung im entsprechenden wasseraufnahmefähigen Szintillator wird die Genauigkeit der Messung wesentlich verbessert.

Thymin

Zur Begründung der Versuche möchte ich hier kurz auf den Aufbau des Thymins und seinen Weg im tierischen Organismus eingehen.

Das Thymin ist ein Nucleosid, das sich aus der Pyrimidinbase Thymin und der Desoxyribose zusammensetzt. Es wird nur von der DNS in ihr Molekül eingebaut. Das von uns verwandte Tritium-Thymin war am C₄ des Pyrimidinrings mit ³H markiert. Wir erhielten es vom Radiochemical Centre in Amersham, England, mit einer Aktivität von $\bar{1},9 \text{ C/mMol}$.

In den Jahren 1930 war es gelungen, mit Hilfe der Feulgenschen Reaktion (Feulgensche Kernfärbung) selektiv die Desoxyribonucleinsäure anzufärben. Dabei zeigte sich, daß die DNS im Zellkern, und zwar in den Chromosomen, lokalisiert ist. Dieser Schluß konnte noch mit anderen Methoden bestätigt werden.

Die Grundlage der DNS ist eine lange Kette, deren Glieder abwechselnd von Desoxyribose und Phosphorsäure gebildet werden und durch eine Diesterbindung miteinander verknüpft sind. Am C₁-Atom jedes Zuckermoleküls ist über eine N-glykosidische Bindung eine organische Base befestigt. Die Sequenz dieser

Basen entscheidet über die Spezifität jeder Nucleinsäure. In der DNS sind es die Purinderivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinabkömmlinge Thymin und Cytosin. Nach dem Modell von WATSON und CRICK wird das endgültige DNS-Molekül von zwei solchen Ketten gebildet, die spiralig ineinander verdreht und durch Wasserstoffbrücken zwischen den Basen miteinander verbunden sind. Entscheidend ist dabei, daß diese H-Brücken nur zwischen bestimmten Basen gebildet werden können. Danach steht im DNS-Molekül dem Adenin immer ein Thymin, dem Cytosin immer ein Guanin gegenüber. Die Spaltung des Moleküls erfolgt durch die Auflösung der Wasserstoffbrücken. In der anschließenden Synthese sichert die oben genannte Tatsache eine genaue Kopierung der abgespaltenen Basensequenz. Das Thymidin wird dabei nur von der DNS eingebaut, während die Ribonucleinsäure stattdessen Uridin enthält. Dieser Umstand gibt uns die Möglichkeit der selektiven Markierung der DNS mit radioaktiven Isotopen.

Die Aufgabe der Desoxyribonucleinsäure ist die Speicherung von Informationen, die einmal in der lebenden Zelle verwertet werden (EW-Synthese), zum anderen aber unverändert auf die Tochterzelle zu übertragen sind. Da nun jede Zelle außer den Geschlechtszellen die gleiche Chromosomenzahl besitzt (sofern nicht Polyploidie vorliegt), ist auch die Menge der DNS pro Zelle annähernd konstant.

METHODIK

1. Arbeitsgang

Zur Messung der Tritiumaktivität unseres Gewebes benutzten wir die in der Einleitung erwähnte Verbrennungsmethode. Die Apparatur bestand aus einem abgeschlossenen System; ein 2-Liter-Glaskolben wurde mit einem Gummikorken verschlossen, in dem zwei zugeschmolzene Glasrohre steckten. Der Arbeitsgang im einzelnen war dabei folgender:

Ein 2-Liter-Erlenmayerkolben wurde eine Minute lang mit Sauerstoff durchspült. Die Ausströmgeschwindigkeit aus der O₂-Flasche stellten wir auf 15 Liter/Min. Anfänglich hatten wir dickwandige Saugflaschen verwendet, die auf einen Druck von 3 atm geprüft waren. Später benutzten wir normale Erlenmayerkolben aus Solidexglas, die auf Grund ihrer geringeren Wanddicke eine schnellere Zündung ermöglichten.

Als Grundstoff für die Verbrennung, sowohl für Flüssigkeit als auch für Gewebe, benutzten wir weißes Filterpapier mit einem ungefähren Gewicht von 100 mg. Diese Menge genügte, um 0,2 ml Flüssigkeit vollständig aufzusaugen. Die Gewebeproben, deren Feuchtgewicht bis zu 200 mg betragen kann, wurden in das Papier eingewickelt.

Die zur Verbrennung bestimmte Probe wurde an einem Platindraht befestigt, der in ein Glasrohr eingeschmolzen war, das im Gummikorken der Flasche steckte. Durch eine Drehung des leicht gebogenen Glasrohres wurde die Probe möglichst nahe an die Wand der Flasche gebracht, ohne sie jedoch zu berühren. Die meist noch trockene Papierspitze sollte der Glaswand am nächsten kommen, um eine leichte und schnelle Zündung zu ermöglichen. Die Zündung erfolgte durch einen Spiegelbrenner (nach KLEIN), in dessen Brennpunkt die Probe hing. Wir verwendeten einen elektrischen Brenner von 500 W mit Quarzglaszylinder der Firma Bühler in Tübingen. Man sollte beachten, daß auch der Brenner die Wand der Flasche nicht berührt. Trotz dieser Maßnahmen führten wir alle Verbrennungen

im Abzug hinter Sicherheitsglas durch.

Flüssigkeiten bis zu 0,2 ml und Gewebeproben mit 200 mg Feuchtgewicht verbrannten in 60 - 90 Sekunden. Die Verbrennung erfolgte in 95 von 100 Fällen sofort und ohne Rückstände. In anderen Fällen beließen wir die Proben so lange im Brennpunkt, bis sie vollständig verglüht waren.

Die Flasche wurde jetzt sofort auf eine Trockeneisscheibe gestellt. Nach 30 Minuten lag die Temperatur am Boden unter -20°C . Nach weiteren 15 Minuten war eine fast vollständige Kondensation des Wasserdampfes garantiert. Um äußere Einflüsse auszuschalten und konstante Ergebnisse zu erzielen, umgaben wir die Flasche noch mit einem angefeuchteten Mantel.

Nach 45 Minuten Trockenzeit pipettierten wir 20 ml Szintillator ein. Der Szintillator sollte dabei so eingefüllt werden, daß er sofort den ganzen Boden bedeckt. Anschließend wurde die Flasche wieder gut verschlossen in ein Eiswasserbad gestellt. Nach 10 Minuten wurden 18 ml Szintillator entnommen und in das Meßglas gefüllt. Als Szintillator verwendeten wir folgendes Gemisch: (nach BRAY)

Naphthalin	60,0 g
PPO	4,0 g
POPOP	0,2 g
Methanol	100,0 ml
Äthylenglykol	20,0 ml
Dioxan, reinst	ad 1000,0 ml

Dieser Szintillator nimmt bis zu 10% Wasser auf. Er ergibt für Tritium bei Messung in einem Tri-Carb-Liquid-Szintillation Counter der Firma Packard, USA, einen Wirkungsgrad von 25 %.

Tritium ist ein β -Strahler, wobei die emittierten Strahlen die verschiedenen Energien bis zur maximalen Energie von 18 keV besitzen. Die im flüssigen Szintillator ausgelösten Szintillationen sind in ihrer Lichtstärke abhängig von der dabei absorbierten Energie. Diese Lichtenergie kann durch verschiedene chemische Substanzen oder färbende Beimengungen der Szintillationsflüssigkeit abgebremst werden (Quencheffekt.) Damit tritt aber eine Verschiebung des zu messenden Spektrums in einen niedrigeren Energiebereich ein. Diese Verschiebung kann durch die Aufteilung des Energiebereiches in 2 Spektrometerkanäle dadurch gemessen werden, daß sich das Impulsverhältnis beider Kanäle ver-

schiebt (s. Abb. 1).

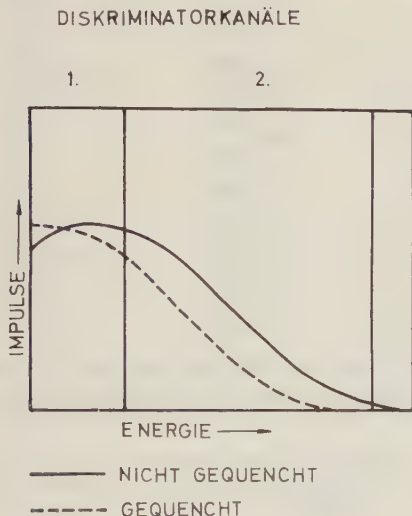


Abb. 1:

Die Wirkung des Quench-
effekts am β -Spektrum
(aus Nuclear-Chicago,
Technical Bulletin Nr. 13,
1962, E.T. Bush)

Wenn man nun das Kanalverhältnis in verschiedenen Situationen, zum Wirkungs-
grad in Beziehung setzt, so erhält man eine Gerade (s. Abb. 2). Damit ist es
möglich, bei bekanntem Kanalverhältnis den jeweiligen Wirkungsgrad abzulesen.

2. Eichung

Bei den Verbrennungen war eine geringfügige, aber unterschiedliche Rauchent-
wicklung festzustellen. Die dadurch bedingte Verfärbung des Meßgutes und der
unterschiedliche Wassergehalt hatten einen Quencheffekt zur Folge. Um diese
Schwankungen auszuschalten, wurde regelmäßig in zwei verschiedenen eingestell-
ten Diskriminatorkanälen gemessen. Mit Hilfe der unten angeführten Ergebnisse
(Tab. 1-3) stellten wir eine Eichkurve auf, die uns den Zusammenhang zwi-
schen dem Kanalverhältnis und dem Wirkungsgrad zeigte.

Nach der oben angeführten Methode wurden 0,1 ml THO mit einer Aktivität von
 $19,42 \times 10^4$ Imp/ml/min. auf Filterpapier pipettiert und verbrannt. Dabei hat-
ten wir folgende Ergebnisse (Tab. 1):

Proben Nr.	1. Kanal Imp./min.	2. Kanal Imp./min.	Kanalver- hältnis	Wirkungs- grad in %
1	3981	875	0,281	20,49
2	3679	761	0,260	18,94
3	3960	887	0,288	20,39
4	4096	934	0,295	21,09
5	4305	989	0,298	22,17
6	3954	870	0,282	20,36
7	3830	832	0,277	19,72
8	3964	841	0,278	19,89
9	3814	830	0,278	19,63
10	3964	843	0,270	20,15

Nach einigen Reparaturarbeiten am Meßgerät stieg die Ausbeute deutlich an, was durch Veränderungen in der Elektronik bedingt war. Dies machte eine zweite Versuchsserie notwendig (Tab. 2):

Proben Nr.	1. Kanal	Kanalver- hältnis	Wirkungs- grad
1	4066	0,258	20,76
2	3825	0,240	20,65
3	4250	0,267	22,22
4	4003	0,249	20,93
5	4045	0,260	21,15
6	4313	0,268	22,55
7	4115	0,258	21,52
8	4095	0,261	21,41
9	4289	0,258	22,10
10	4225	0,262	22,09

Aus den angeführten Werten errechneten wir eine Gerade, die uns den Zusammenhang zwischen Kanalverhältnis und Wirkungsgrad aufzeigte. Die mittlere Abweichung der Einzelwerte betrug $\pm 0,90\%$ (2s-Bereich) (s. Abb. 2).

Bestimmung der Ausbeute:

Um den Aktivitätsverlust bei den Verbrennungen festzustellen, führten wir Versuche durch, bei denen die oben verwandte THO-Menge direkt in Meßfläschchen eingefüllt wurde (Tab. 3). Das angeführte Zahlenmaterial ergab im Vergleich zu der nach Tabelle 2 errechneten Geraden im Mittel eine Ausbeute von 93 %. Die mittlere Schwankungsbreite war dabei $\pm 2,17\%$ (2 s).

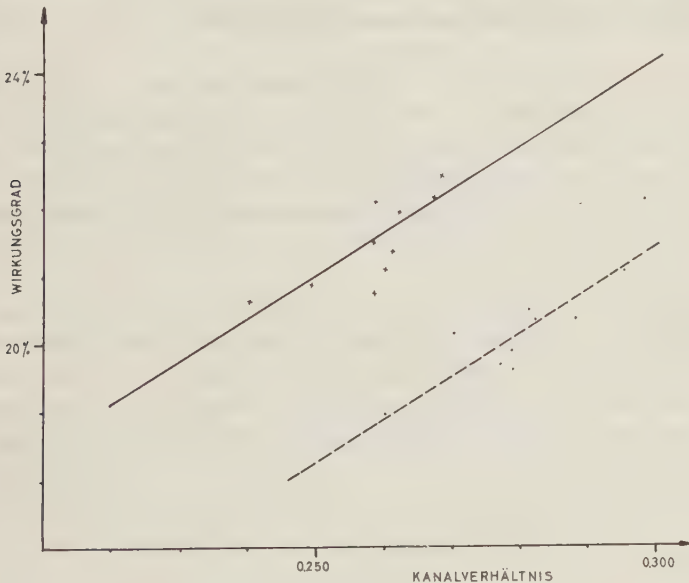
Da bei unseren Gewebeverbrennungen der Wirkungsgrad in fast allen Fällen bei 21% lag,

mußte man bei einer Rückgewinnung von 93 % mit einer Fehlerbreite von $\pm 4\%$ rechnen.

Proben	1. Kanal	Kanalver- hältnis	Wirkungs- grad
1	5066	0.301	26,49
2	5105	0.304	26,69
3	5054	0.308	26,43
4	5021	0.306	26,26
5	5134	0.306	26,85
6	5019	0.307	26,24
7	5198	0.317	27,18
8	5120	0.309	26,77
9	5022	0.309	26,26
10	5063	0.310	26,48

Abb. 2: Zusammenhang zwischen Wirkungsgrad und Kanalverhältnis.

-----: Die zuerst ermittelten Werte. ———: Die endgültigen Werte
(vergl. Tab. 1, S. 8) (vergl. Tab. 2, S. 8)



3. Tiermaterial

Für die Untersuchungen der Tritium-Thymidin-Verteilung im Gewebe verwendeten wir ausschließlich Ratten des Druckrey-Stammes. Sie wurden seit 5 Jahren im institutseigenen Tierstall gezogen. Das Gewicht der Versuchstiere lag zwischen 180 und 300 g. Nachdem sie ^3H erhalten hatten, wurden sie von den übrigen Tieren getrennt.

Das TTh injizierten wir intraperitoneal, nachdem wir es mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt hatten. Bei der von uns verwendeten Menge, $0,25 \mu\text{C}$ pro Körpergewicht, konnten innere Strahlenschäden durch den TTh-Zerfall mit Sicherheit ausgeschaltet werden (CRONKITE, BOND, FLIEDNER, RUBINI).

Zwei Stunden nach der Injektion wurden die Tiere mit Leuchtgas getötet. Nach dieser Zeit war eine genügende Resorption und Verteilung im Tierkörper gewährleistet.

Bei der sofort vorgenommenen Sektion entnahmen wir Gewebeproben von Leber, Milz, Duodenum, Colon und quergestreifter Muskulatur sowie einige ml Blut. Nach schnellem Abwiegen der Filterpapiertütchen ohne und mit Gewebe, verarbeiteten wir die Proben in der oben beschriebenen Weise.

ERGEBNISSE

1. Vor Bestrahlung:

Um festzustellen, wie sich ionisierende Strahlen auf den Tritium-Thymidin-Einbau des Gewebes und damit auf seine DNS-Synthese auswirken, untersuchten wir zunächst den TTh-Gehalt des normalen, unbestrahlten Gewebes 2 Stunden nach Gabe des markierten Nukleosids. Wie aus autoradiographischen Untersuchungen am hiesigen Institut (FEINE) hervorgeht, erreicht die Markierung der Zellen nach 40 Minuten ein Plateau. Danach ist keine weitere Aktivitätszunahme mehr zu verzeichnen. Die Markierung der Mitosen beträgt 2 Stunden nach Gabe des TTh im Keimzentrum der Milz 95 %, in der Schleimhaut des Duodenums über 90 %, im Colon 100 %. Aus dem Blut verschwindet das markierte Thymidin im Lauf von 20 Minuten, die danach neu einsetzende Aktivitätszunahme ist auf Tritium-Wasser, als Abbauprodukt des Thymidins, zurückzuführen (CRONKITE).

Als Bezugspunkt für die jeweilige Aktivität der oben genannten Gewebearten wählten wir die quergestreifte Muskulatur. Die autoradiographischen Untersuchungen zeigten hier unter jeweils 10 000 ausgezählten Zellen keine Markierungen (FEINE). Die mit der Verbrennungsmethode gemessene Aktivität im quergestreiften Muskel und im Gehirn entspricht also der Grundaktivität, die wohl durch den Abbau des TTh's zu Wasser und anderen Stoffwechselprodukten entsteht.

Um ein möglichst genaues Bild über den Aktivitätsgehalt zu bekommen, untersuchten wir von jeder Gewebeart drei Proben mit einem durchschnittlichen Gewicht von 70 mg. Die gemessene Impulszahl wurde auf 1 mg umgerechnet. Diese drei Werte zeigten im Mittel eine einfache mittlere Schwankungsbreite von 10 %. Die Mittelwerte dieser drei Proben setzten wir ins Verhältnis zum Wert der Muskelaktivität.

Dabei hatten wir folgende Ergebnisse :

Tier Nr.	370	371	372
Leber/ Muskel	1,6	1,6	1,5
Milz/ Muskel	3,2	3,5	2,9
Duodenum/ Muskel	6,9	5,1	5,4
Colon/ Muskel	5,5	4,4	5,2
Blut/ Muskel	12,3	11,9	14,3

Die Aktivität der quergestreiften Muskulatur setzten wir gleich 1. Danach ergab sich für die Aktivität der Leber im Mittel das 1,56fache, der Milz das 3,2fache, des Duodenums das 5,8fache, des Colons das 5,0fache und die des Blutes das 12,8fache. Es zeigten sich also deutliche Unterschiede in der Aktivität und damit im TTh-Einbau der einzelnen Gewebearten. Da der Thymidineinbau parallel geht mit der DNS-Synthese, diese wiederum proportional der Zellvermehrung, können wir von der jeweils gemessenen Aktivität auf die Zellproliferation schließen.

2. Nach Bestrahlung:

Nachdem wir den Tritium-Thymidin-Gehalt des normalen, unbestrahlten Gewebes festgestellt hatten, führten wir eine Reihe von Versuchen durch, bei denen die Tiere einer Dosis von 500 r ^{60}Co -Gammastrahlen in Tiermitte ausgesetzt wurden. Durch das ausgeblendete Feld auf den Mittelbauch wurden vor allem Leber, Milz, Duodenum und Colon bestrahlt. Wir injizierten das TTh zwei Tieren 1 Stunde und jeweils drei Tiere 3, 6, 9 und 24 Stunden nach der Bestrahlung. Zwei Stunden später wurden sie getötet.

Wie bei den unbestrahlten Tieren untersuchten wir auch hier von jeder Gewebeart drei Proben. Das durchschnittliche Gewicht vor der Verbrennung betrug 80 mg. Die gemessene Impulszahl wurde auf 1 mg umgerechnet. Die Werte zeigten im Mittel eine Schwankungsbreite von 7,5 %. Die Mittelwerte setzten wir wiederum ins Verhältnis zur Muskelaktivität, die durch die Bestrahlung nicht beeinflusst worden war.

Die bei den unbestrahlten Tieren gewonnenen Werte möchte ich im Folgenden als Kontroll- oder Normalwerte bezeichnen.

1 Stunde nach Bestrahlung zeigte sich ein starker Abfall des Tritiumgehaltes in der Milz, dem Duodenum und Colon. Die Werte liegen sehr nah beieinander. In der Milz sank die Aktivität auf 46,8 %, im Duodenum auf 44,8 % und im Colon auf 39 % des Kontrollwertes.

3 Stunden nach Bestrahlung zeigten die Milz noch 43,7 %, das Duodenum noch 25,1 % und das Colon 30,0 % der Normalwerte.

6 Stunden nach Bestrahlung erreichte die Aktivitätskurve von Duodenum und Colon ihren Tiefpunkt. Wir konnten im Duodenum noch 15,5 %, im Colon noch 18,0 % der Aktivität unbestrahlter Tiere messen. Das Milzgewebe zeigte keinen solch erheblichen Abfall der aufgenommenen Tritiummenge. Hier lag die Aktivität nach 6 Stunden bei 40,6 % des Kontrollwertes.

9 Stunden nach Bestrahlung hatte bereits die Erholungsphase eingesetzt. Das Duodenalgewebe wies 28,6 %, das Dickdarmgewebe 26,0 % der Normalaktivität auf. In der Milz waren noch keine Änderungen festzustellen.

24 Stunden nach Bestrahlung nahmen Duodenum, Colon und Milz wieder mehr als 50 % der TTh-Menge unbestrahlter Tiere auf. Die gemessenen Werte lagen in der Milz bei 53 %, im Colon bei 54 % und im Duodenum bei 58,5 % der Normalwerte.

Der Aktivitätsgehalt der Leber und des Blutes zeigte auch nach der Bestrahlung lediglich Schwankungen um den Kontrollwert.

Die gemessenen Aktivitäten der einzelnen Tiere nach Bestrahlung
im Verhältnis zur Muskelaktivität (Tab. 5)

In Klammer = Anteil am Kontrollwert in Prozent

	unbestrahlt	1. Std.	3 Std.	6 Std.	9 Std.	24 Std.
Leber	1,56 (100 %)	1,50 (96 %)	1,60 (102,5 %)	1,60 (102,5 %)	1,66 (106,5 %)	1,63 (104,4 %)
Milz	3,2 (100 %)	1,5 (46,8 %)	1,4 (43,7 %)	1,3 (40,6 %)	1,3 (40,6 %)	1,7 (53 %)
Duodenum	5,8 (100 %)	2,6 (44,8 %)	1,46 (25,1 %)	0,9 (15,5 %)	1,66 (28,6 %)	3,4 (58,6 %)
Colon	5,0 (100 %)	1,95 (39,0 %)	1,50 (30,0 %)	0,9 (18,0 %)	1,3 (26,0 %)	2,7 (54,0 %)
Blut	12,8 (100 %)	13,3 (103,9 %)	13,5 (105,4 %)	13,0 (101,5 %)	13,5 (105,4 %)	12,2 (95,3 %)

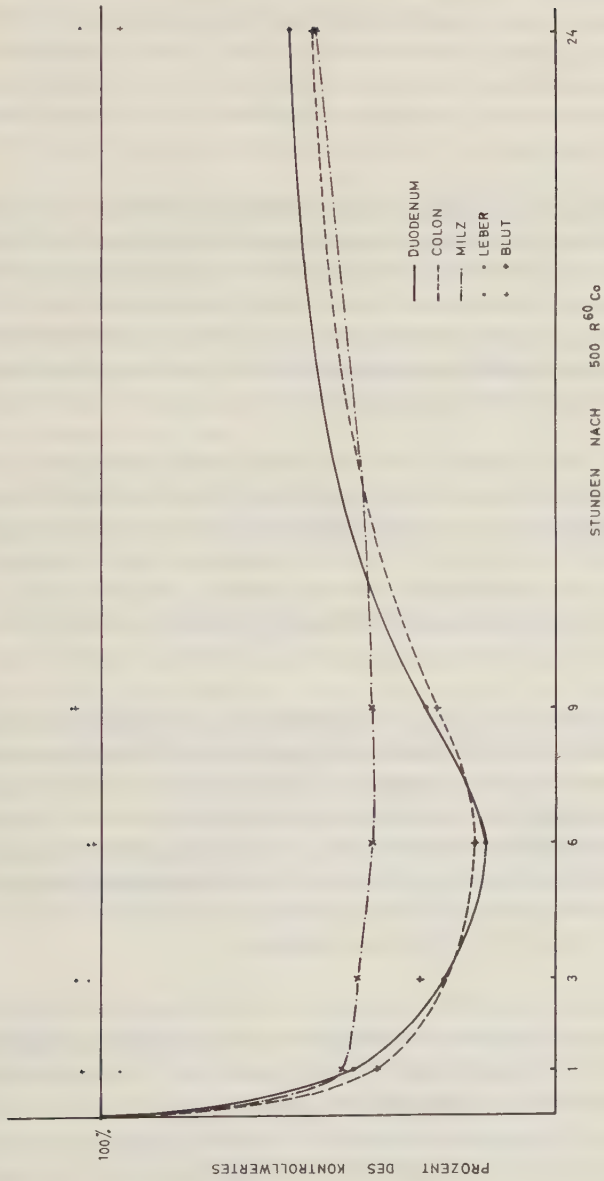


Abb. 3: Die relative Tritiumaktivität verschiedener Gewebe der Ratte nach Bestrahlung, in Prozent der Kontrollmittelwerte.

DISKUSSION

1. Vor Bestrahlung:

Wie eingangs schon erwähnt, wirkt die ionisierende Strahlung vor allem auf die Zellteilung und ihre Vorbereitung. Die vorliegende Arbeit über den Tritium-Thymidin-Gehalt verschiedener Gewebe wurde im Rahmen einer ausführlichen autoradiographischen Untersuchung über die Strahlenwirkung auf die DNS-Synthese durchgeführt. Sie hatte in erster Linie den Zweck, einige Ergebnisse der autoradiographischen Auszählungen mit den Resultaten einer meßtechnischen Methode zu vergleichen und sie zu ergänzen.

Mit der Frage der DNS-Synthese haben sich in den letzten Jahren sehr viele Autoren beschäftigt. Die dabei erzielten Ergebnisse sind jedoch zum Teil noch widersprüchlich. Untersuchungen über die DNS-Synthese am normalen Gewebe, Beschreibungen und Deutungen des Markierungsvorganges nach Tritium-Thymidin-Gaben, finden sich insbesondere bei den Autoren HUGHES et al., LEBLOND et al., MAURER und KOBURG, OEHLERT und BÜCHNER, SCHULTZE und OEHLERT.

1906 formulierten BERGONIÉ und TRIBONDEAU den Zusammenhang zwischen der Strahlenempfindlichkeit der Zelle einerseits, ihrem Differenzierungsgrad und der Vermehrungsfähigkeit andererseits. Danach verhält sich die Strahlensensibilität der Zelle proportional zu ihrer Vermehrungsfähigkeit und umgekehrt proportional zu ihrem Differenzierungsgrad. Die zuletzt genannte Beziehung kann heute damit erklärt werden (R. BAUER), daß die Vermehrungsfähigkeit mit steigender Differenzierung nachläßt. Der empfindlichste Punkt der Zelle für ionisierende Strahlen ist damit ihr Teilungsmechanismus.

Danach trafen wir die Auswahl der von uns zu untersuchenden Gewebearten unter den Gesichtspunkten des Differenzierungsgrades und der Vermehrungsfähigkeit der jeweiligen Zellen. Die zunehmende Differenzierung der Zellen geht bekanntlich weitgehend parallel mit der Abnahme ihrer Fähigkeit zur Teilung und damit zur Regeneration.

In unserer Auswahl sind es vor allem die Zellen des Muskelgewebes, die die Fähigkeit verloren haben, sich durch Mitose zu teilen. Wie schon erwähnt, wurden hier bei der autoradiographischen Untersuchung keine Markierungen mit Tritium beobachtet (FEINE). Die bei der Verbrennungsmethode gemessene Aktivität konnte deshalb als Maß für die Grundaktivität gewählt werden. Sie setzt sich zusammen aus dem Tritium-Gehalt des Blutes und der interzellulären Flüssigkeit. Als Ursache müssen Abbauprodukte des Thymidins angenommen werden.

Das Lebergewebe zeigt bei ausgewachsenen Individuen nur noch eine geringe Zellmauserung. Man findet nur noch einzelne Mitosen. Dem entspricht die anderthalbfache Grundaktivität.

In der Milz findet zwar bei der Lymphozytenbildung eine starke Vermehrungstätigkeit statt, mengenmäßig wird davon jedoch nur ein Teil des gesamten Organorgewebes erfaßt. Dies drückt sich in der gegenüber den Darmepithelien nur 3,2fachen Grundaktivität aus.

Die Epithelien des Darmes zeigen schon unter normalen Verhältnissen eine ständige Erneuerung durch Teilung. Die höhere Zahl der Mitosen führt dementsprechend zu einer erhöhten Aktivität.

Zusammenfassend kann man also sagen, die gemessenen Aktivitätswerte gehen parallel mit der Proliferationstendenz der genannten Gewebe. Je stärker die mitotische Teilung ausgeprägt ist, um so höher sind die von den unbestrahlten Zellen aufgenommenen Mengen an Tritium-Thymidin. Die Ursache dafür liegt in der Tatsache, daß vor der Teilung die vorhandene Desoxyribonukleinsäuremenge verdoppelt wird, und dies die einzige Synthese ist, bei der Thymidin benötigt wird. Wichtig ist dabei noch, daß, wie aus den autoradiographischen Untersuchungen (FEINE) hervorgeht, eine Thymidinaufnahme in die Zelle ohne eine gleichzeitig ablaufende DNS-Synthese weitgehend ausgeschlossen werden kann.

2. Nach Bestrahlung:

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen am bestrahlten Gewebe bestätigen das Bergonié-Tribondeau'sche Gesetz. Die hochdifferenzierten Zellen des Muskelgewebes und der Leber zeigen sich von der Bestrahlung fast unbeeinflusst. Mit zunehmender Vermehrungstätigkeit steigt die Strahlenempfindlichkeit. Je hö-

her der TTh-Einbau des normalen Gewebes ist, um so stärker fällt der Aktivitätsgehalt nach der Bestrahlung ab. Dieses Ergebnis, das sich zu gleicher Zeit auch bei den autoradiographischen Untersuchungen ergab, bestätigt die Anwendbarkeit der dazu verwandten und von uns für diese Untersuchungen modifizierten Verbrennungsmethode.

Über die Ursachen der nachlassenden DNS-Synthese nach der Bestrahlung besteht noch keine einheitlich klare Meinung. Nach den bisherigen Untersuchungen kommen hauptsächlich folgende Mechanismen in Frage:

- 1.) Eine Depolymerisation der DNS-Moleküle nach Bestrahlung, wie sie an in-vitro Versuchen von SPARROW, ROSENFELD 1942 und von TAYLER et.al. nachgewiesen wurde.
- 2.) Die Änderungen der Basen der DNS, die selbstverständlich eine Störung ihrer Funktion und ihrer Verdoppelung zur Folge haben.
- 3.) Die Bildung von ionisierten OH- und H-Radikalen, die sich sehr schnell mit anderen Ionen und Molekülen zu H_2O_2 und H_2 verbinden, die dann auf Grund ihrer starken Oxydationswirkung wieder mit den organischen Molekülen reagieren. Die dabei ablaufenden Reaktionsketten sind jedoch noch nicht voll geklärt.
- 4.) Eine Störung der Polymerasebildung, die kurz vor der Synthesephase der DNS einsetzt und nach den Untersuchungen von HOWARD und PELC einen besonders strahlensensiblen Abschnitt im Zellstoffwechsel darstellt.

Mit der oben beschriebenen Verbrennungsmethode wurde eine Abnahme der im Gewebe vorhandenen Tritium-Thymidin-Menge festgestellt. Es handelt sich dabei eindeutig um eine Folge der Bestrahlung. Über die direkten Ursachen kann jedoch nur in Form von Schlußfolgerungen etwas ausgesagt werden. Danach kommen für uns folgende Möglichkeiten in Betracht:

- 1.) Die gesamte Zellzahl vermindert sich.
- 2.) Die Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen sinkt.
- 3.) Die Aufnahme des Tritium-markierten Thymidins wird von den synthetisierenden Zellen eingeschränkt.

Bevor ich darauf nun näher eingehe, möchte ich einige wichtige Tatsachen erwähnen, die sich zum Teil aus den autoradiographischen Untersuchungen über die DNS-Synthese und die Strahlenwirkung (FEINE) ergeben:

- a) Die Untersuchungen von NYGAARD und POTTER am Zellhomogenat sowie die am hiesigen Institut gewonnenen Ergebnisse stimmen darin überein, daß der Zellzerfall nach der Einwirkung ionisierender Strahlen unabhängig ist von der Zellphase, in der sich die Zelle während der Bestrahlung befindet. Es geht also der gleiche Prozentsatz markierter wie unmarkierter Zellen zugrunde. Die Relation der synthetisierenden Zellen zu den in Ruhe befindlichen ist durch die Bestrahlung nicht verändert.
- b) Die Bestimmung des Zellzyklus der Duodenalkryptenzellen ergibt eine Synthesephase von 8 - 9 Stunden, eine praemitotische Ruhephase sowie eine Mitosephase von 1 Stunde. Vom Zeitpunkt der Teilung bis zum erneuten Eintritt in die Synthese benötigt die Zelle ungefähr 16 Stunden.

Danach ist die Möglichkeit der selektiven Vernichtung bestimmter Zellen ausgeschlossen.

Daß sich nach einer Bestrahlung die gesamte Zellzahl vermindert, ist bekannt. Wenn jedoch sonst keine Änderungen eintreten würden, hieße das nach unseren Untersuchungen, daß 6 Stunden nach Bestrahlung im Duodenum nur noch 15,6 %, im Colon nur noch 18 % der Zellen funktionsfähig sind. Da aber beide Gewebearten 3 Stunden später wieder fast die doppelte TTh-Menge (28,6 % bzw. 26 %) aufnehmen, muß sich der Zellbestand in der Zwischenzeit entsprechend vermehren. Dies ist nach den angegebenen Zeiten des Zellzyklus aber nicht möglich.

Somit muß als weitere Ursache für den verminderten Thymidin-Gehalt nach Bestrahlung eine verminderte Aufnahme des markierten Nukleosids in die DNS-synthetisierenden Zellen angenommen werden.

Daß es sich hierbei, wie von LAJTHA angenommen wurde, um einen Verdrängungseffekt des markierten Thymidins durch das aus den zerfallenden Zellen freierwerdende, unmarkierte handelt, konnte durch die autoradiographischen Untersuchungen (FEINE) widerlegt werden.

Der starke Abfall des Thymidingehaltes nach 1 Stunde auf unter 50 % des Kontrollwertes muß als Folge einer direkten Beeinflussung der Zellen gedeutet werden, die sich während der Einwirkung der ionisierenden Strahlen in der DNS-Synthesephase befanden. Wären nur die Zellen gestört worden, die sich kurz vor dieser Phase befanden, wie es nach den Untersuchungen von HOWARD und PELC zu sein scheint, dann hätten wir einen wesentlich langsameren Abfall registrieren müssen.

Der weitere Abfall der Aktivitätskrve zwischen der 1. und 6. Stunde weist auf eine zusätzliche Schädigung der Zellen, die während der Bestrahlung kurz vor der Synthese standen. Anderenfalls müßte die Kurve wieder ansteigen. Ein Teil der Senkung ist natürlich auch durch den Zelluntergang bedingt, dessen Einsetzen 3 - 6 Stunden nach der Bestrahlung im Mikroskop beobachtet wurde. Der 1- und 6-Stundenwert und die danach einsetzende Erholungsphase lassen erkennen, daß die DNS-Synthese nach der Bestrahlung nicht vollständig eingestellt wurde. Es muß also eine Verringerung der TTh-Aufnahme der einzelnen Zellen angenommen werden.

Eine andere Deutungsmöglichkeit dieser Erscheinung wäre, wenn wir durch die Bestrahlung die Schädigung eines oder mehrerer Fermente annehmen, die bei der Synthese notwendig sind. Dann sinkt die Syntheserate so lange ab, bis die zerstörten Enzyme sich wieder zu regenerieren beginnen. Der relativ steile Anstieg zwischen der 6. und 9. Stunde läßt beide angeführten Möglichkeiten zu.

Daß sich nach 24 Stunden die Thymidinaufnahme nur bis kanpp über 50 % des Kontrollwertes erholt hat, liegt wohl vor allem an der verminderten Zellpopulation.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von radioaktiv markiertem Thymidin in verschiedenen Geweben der Ratte vor und nach Bestrahlung mit 500 r Co^{60} untersucht. Da das Thymidin nur in die DNS eingebaut wird, sind Rückschlüsse auf die DNS-Synthese möglich.

Zunächst modifizierten wir die Nachweisttechnik von SCHÖNINGER, wobei wir die in Papier eingewickelten Gewebeproben mit einem Spiegelbrenner von außen entzündeten. Die Untersuchung umfaßte Muskel, Leber, Milz, Duodenal- und Colon-Gewebe sowie Blut. Die gefundenen Ergebnisse zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der normalen Proliferationsfähigkeit und dem Rückgang der DNS-Synthese nach der Bestrahlung.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Alvarez, L.W. u. Cornog, R.:
"Helium and Hydrogen of mass 3"
Physic. Rev. 56 (1939): 613
- 2) Bauer, R.:
"Untersuchungen über die Einwirkungen unterschied-
lich verabfolgter Röntgenbestrahlung auf das Knochen-
mark und seine Zellelemente, zugleich ein Beitrag
zum Zeitfaktorproblem".
Strahlentherapie 67 (1940): 424
- 3) Bergonié, J. u. Tribondeau, L.:
"Action des rayon x sur le testicule"
Arch. Elet. méd. 14 (1906): 779 u. 874
- 4) Bray, G.A.:
Anal. Biochem. 1, 279 (1960)
- 5) Bush, E.T.:
"How to Determine Efficiency Automatically in
Liquid Scintillation Counting"
Nuclear-Chicago, Technical Bulletin Nr. 13 (1962).
- 6) Cronkite, E.P., Bond, V.D., Flidner, T.M., Rubini, J.R.:
"The use of tritiated thymidine in the study of DNA-syn-
thesis and cell turnover in hoemopoetic tissues"
Laboratory Invest. 8 (1959): 263
- 7) Von Euler, H., von Hevesy, G.:
"Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Umsatz der
Nucleinsäure im Jensen-Sarkom"
Ark. kemi. mineral. a. geologoc 17A (1943-44):
1 und Kgl. Danske Videnskab. Selskab. Biol. Med.
17 (1942): 1

- 8) Feine, U. : "Zur Bestimmung von Tritium im Gewebe und anderen biologischen Proben"
Atompraxis 9 (1963): 357
- 9) Feine, U. : "DNS-Synthese und Strahlenwirkung"
Habilitationsschrift Tübingen (1963)
- 10) Feine, U. : "Radionuklide in der klinischen und experimentellen Onkologie"
Herausgegeben von G. Hoffmann und K.E. Scheer
Schattauer-Verlag Stuttgart (1965): 119
- 11) Harbers, E. : "Wirkung ionisierender Strahlen auf die Nucleinsäuren"
Strahlentherapie 112 (1960): 333
- 12) Howard, A., Pelc, S.R. :
"Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage".
Heredity G., Suppl. (1953): 261
- 13) Hughes, W.L. : "Autoradiography with tritium: the duplicating mechanism chromosomes and the chronology of events related to nucleic acid synthesis"
Vol 25: Isotopes in Biochemistry and Physiology.
Part 2 Genf 1958: 203
- 14) Kalberer, F., Rutschmann, J. :
"Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem organischem Probematerial mittels Flüssigkeitsszintillations-Zählers".
Helv. Chimica Acta 44 (1961): 1956
- 15) Karlson, P. : "Kurzes Lehrbuch der Biochemie"
1. Auflage, Stuttgart 1961
- 16) Lajtha, L.G., Oliver, R., Kumatori, T., Ellis, F. :
"On the mechanism of radiation effect on DNA-synthesis"
Rad. Res. 8 (1958): 1

- 17) Leblond, C.P., Messier, B., Kopriwa, B. :
"Thymidine- H^3 as a tool for the investigation of the
renewal of cell populations".
Lab. Inv. 8 (1959): 296
- 18) Maurer, W., Koburg, E. :
"Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thyminidin
über den zeitlichen Verlauf der DNS-Synthese bei den
Epithelien des Darmes und bei anderen Zellarten der
Maus".
Verh. dtsh. Ges. Path. (1961): 108
- 19) Nygaard, F.O., Potter, R.L. :
"Effect of x-radiation on DNA-metabolism in various
tissues of the rat".
III. Retention of labeled DNA in normal and irradiated
animals.
Radiation Res. 12 (1960): 131
- 20) Oehlert, W., Büchner, T. :
"Mechanismus und zeitlicher Ablauf der physiologischen
Regeneration im mehrschichtigen Plattenepithel und in
der Schleimhaut des Magendarmtraktes der weißen Maus".
Beitr. pathol. Anat. 125 (1961): 374
- 21) Schöninger, W. : "Eine mikroanalytische Schnellbestimmung von Halogen
in organischen Substanzen"
Microchim. Acta (1955): 123
- 22) Schultze, B., Oehlert, W. :
"Autoradiographic investigations of incorporation of
 H^3 -thymidine into cells of the rat and mouse"
Science 131 (1960): 3402
- 23) Sparrow, A.H., Rosenfeld, F.M. :
"X-ray-induced depolymerisation of thymonucleohistone
and of sodium thymonucleat"
Science 104 (1946): 245

Herrn Dozent Dr. med. U. Feine möchte ich herzlich
für die Anregungen und die Kritik an der Arbeit danken.

Herrn Professor Dr. med. R. Bauer danke ich für die
Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, an
seinem Institut zu arbeiten.

LEBENS LAUF

Am 20. November 1940 wurde ich, Detlef Geiger, als erster Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Theodor Geiger und seiner Ehefrau Sigrid Geiger, geborene Streichan, in Stuttgart geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Grundschule und 6 Jahren Oberschule in Vaihingen an der Enz besuchte ich das Gymnasium in Bietigheim, wo ich 1959 das Abitur ablegte.

Seit dem Sommersemester 1959 studierte ich an der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, wo ich im Frühjahr 1962 die ärztliche Vorprüfung und im Frühjahr 1966 das medizinische Staatsexamen ablegte.

